

09/485951

PCT/JP98/03670 5

19.08.98

日本特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 09 OCT 1998
WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

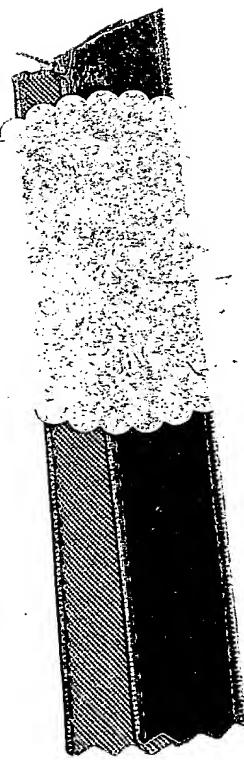
1997年 8月22日

出願番号
Application Number:

平成 9年特許願第226468号

出願人
Applicant(s):

財団法人相模中央化学研究所
株式会社プロテジーン

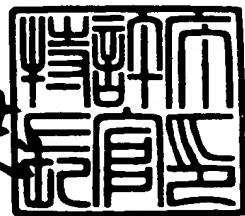


PRIORITY DOCUMENT

1998年 9月25日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平10-3076298

【書類名】 特許願
【整理番号】 S018114
【提出日】 平成 9年 8月22日
【あて先】 特許庁長官殿
【発明の名称】 ヒトガレクチン-9様蛋白質およびそれをコードするc
DNA
【請求項の数】 5
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県相模原市若松3-46-50
【氏名】 加藤 誠志
【発明者】
【住所又は居所】 東京都葛飾区高砂5-13-11
【氏名】 山口 知子
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県相模原市西大沼4-4-1
【氏名】 関根 伸吾
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県相模原市上鶴間5-17-8
【氏名】 鎌田 貢壽
【特許出願人】
【代表出願人】
【識別番号】 000173762
【郵便番号】 229
【住所又は居所】 神奈川県相模原市西大沼4丁目4番1号
【氏名又は名称】 財団法人相模中央化学研究所
【代表者】 近藤 聖
【電話番号】 0427(42)4791
【特許出願人】
【識別番号】 596134998

【郵便番号】 153

【住所又は居所】 東京都目黒区中町2丁目20番3号

【氏名又は名称】 株式会社プロテジーン

【代表者】 棚井 丈雄

【電話番号】 03(3792)1019

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011501

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒトガレクチン-9様蛋白質およびそれをコードするcDNA

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

【請求項2】 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含む、請求項1記載の蛋白質。

【請求項3】 配列番号3で表される塩基配列を含むcDNA。

【請求項4】 配列番号4で表される塩基配列を含む、請求項3記載のcDNA。

【請求項5】 配列番号5で表される塩基配列からなる、請求項3あるいは請求項4記載のcDNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒトガレクチン-9様蛋白質、およびそれをコードしているcDNAに関する。本発明の蛋白質は、医薬や糖鎖研究のための試薬として用いることが出来る。本発明のヒトcDNAは、遺伝子診断用プローブや遺伝子治療用遺伝子源として用いることができる。また、該cDNAがコードしている蛋白質を大量生産するための遺伝子源として用いることができる。

【0002】

【従来の技術】

ガレクチンはガラクトースと結合する動物レクチンの総称である。動物レクチンは細胞質、核、細胞膜表面など様々な部位に存在し、細胞増殖、分化、癌化、転移、免疫などに関与していると考えられている [Drickamer, K., Annu. Rev. Cell Biol. 9: 237-264 (1993)]。これまで、ガレクチン-1からガレクチン-9まで、9種類のガレクチンが知られている。

【0003】

ガレクチン-9は、ホジキン病患者の血清に含まれている抗体と反応する抗原

蛋白質として同定されたレクチンである [Tureci, O. , J. Biol. Chem. 272: 6416-6422 (1997)]。ガレクチン-9は、ガレクチン-4やガレクチン-8と同様、二つの糖鎖結合ドメインが、リンカーペプチドによって連結した構造をとっている。その生体内での本当の役割はまだ完全には解明されていないが、細胞間の接着に関与していると考えられている。マウスでは、分子量が異なる二種類のガレクチン-9が報告されているが [Wada, J. and Kanwar, Y. S. , J. Biol. Chem. 272: 6078-6086 (1997)]、ヒトでは、まだそのようなアイソフォームの報告はない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、ヒトガレクチン-9様蛋白質、およびこれをコードするcDNAを提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは銳意研究の結果、ガレクチン-9様蛋白質をコードするヒトcDNAをクローニングし、本発明を完成した。すなわち、本発明は、ガレクチン-9様蛋白質である、配列番号1あるいは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質を提供する。また本発明は上記蛋白質をコードする、配列番号3から配列番号5で表される塩基配列を含むcDNAを提供する。

【0006】

【発明の実施の形態】

本発明の蛋白質は、ヒトの臓器、細胞株などから単離する方法、本発明のアミノ酸配列に基づき化学合成によってペプチドを調製する方法、あるいは本発明のヒトガレクチン-9様蛋白質をコードするDNAを用いて組換えDNA技術で生産する方法などにより取得することができるが、組換えDNA技術で取得する方法が好ましく用いられる。例えば、本発明のcDNAを有するベクターからインビトロ転写によってRNAを調製し、これを鑄型としてインビトロ翻訳を行なうことによりインビトロで発現出来る。また翻訳領域を公知の方法により適当な発

現ベクターに組換えてやれば、大腸菌、枯草菌、酵母、動物細胞等で、コードしている蛋白質を大量に発現させることができる。

【0007】

本発明の蛋白質を、大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、cDNAクローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに、本発明のcDNAの翻訳領域を組換えた発現ベクターを作成し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養してやれば、該cDNAがコードしている蛋白質を微生物内で大量生産することができる。あるいは、他の蛋白質との融合蛋白質として発現させることもできる。該融合蛋白質を適当なプロテアーゼで切断することによって該cDNAがコードする蛋白質部分のみを取得することもできる。本発明の蛋白質の範囲には、ラクトース結合活性を有するものであれば、該融合蛋白質も含まれる。

【0008】

本発明の蛋白質を、動物細胞で分泌発現させる場合には、該cDNAの翻訳領域を、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する動物細胞用発現ベクターに組換え、動物細胞内に導入してやれば、本発明の蛋白質を細胞外に分泌生産することができる。

【0009】

本発明の蛋白質には、配列番号1で表されるアミノ酸配列のいかなる部分アミノ酸配列を含むペプチド断片（5アミノ酸残基以上）も含まれる。これらのペプチド断片は抗体を作製するための抗原として用いることができる。また、本発明の蛋白質は、細胞外に分泌される。アミノ酸配列の中に糖鎖結合可能な部位が存在するので、適当な動物細胞で発現させれば糖鎖が付加した蛋白質が得られる。したがって、このような糖鎖が付加した蛋白質あるいはペプチドも本発明の蛋白質の範疇にはいる。

【0010】

本発明のDNAには、上記蛋白質をコードするすべてのDNAが含まれる。該DNAは、化学合成による方法、cDNAクローニングによる方法などを用いて

取得することができる。

【0011】

本発明のヒトcDNAは、ヒト細胞由来cDNAライブラリーからクローニングすることが出来る。このcDNAライブラリーはヒト細胞から抽出したポリ(A)⁺RNAを錆型として作製する。ヒト細胞としては、人体から手術などによって摘出されたものでも培養細胞でも良い。実施例では胃癌組織から単離したポリ(A)⁺RNAを用いた。cDNAの合成にあたっては、岡山-Berg法[Okayama, H. and Berg, P., Mol. Cell. Biol. 2: 161-170 (1982)]、Gubler-Hoffmann法[Gubler, U. and Hoffmann, J. Gene 25: 263-269 (1983)]などいかなる方法を用いてもよいが、完全長クローニングを効率的に得るためには、キャッシング法[Kato, S. et al., Gene 150: 243-250 (1994)]を用いることが望ましい。cDNAの同定は、シーケンシングによる全塩基配列の決定、塩基配列から予測されるアミノ酸配列と類似配列を有する既知蛋白質の検索、インビトロ翻訳による蛋白質発現、大腸菌による発現、発現産物の活性測定によって行なう。活性測定は、ラクトースとの結合能を確認することによって行なう。

【0012】

本発明のcDNAは、配列番号3あるいは配列番号4で表される塩基配列を含むことを特徴とするものであり、例えば、配列番号5で表されるものは、1725bpからなる塩基配列を有し、1068bpのオープンリーディングフレームを有している。このオープンリーディングフレームは、355アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしている。この蛋白質はアミノ酸配列レベルでマウスガレクチン-9アイソフォームと69.3%という高い類似性を有している。

【0013】

なお、配列番号3に記載のcDNAの塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドプローブを用いて、ヒト細胞から作製したヒトcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、本発明のcDNAと同一のクローニングを容易に得ることが出来る。

【0014】

一般にヒト遺伝子は個体差による多型が頻繁に認められる。従って配列番号3から配列番号5において、1又は複数個のヌクレオチドの付加、欠失および／又は他のヌクレオチドによる置換がなされているcDNAも本発明の範疇にはいる。

【0015】

同様に、これらの変更によって生じる、1又は複数個のアミノ酸の付加、欠失および／又は他のアミノ酸による置換がなされている蛋白質も、ヒトガレクチン-9様活性を有する限り、本発明の範疇に入る。

【0016】

本発明のcDNAには、配列番号3で表される塩基配列のいかなる部分塩基配列を含むcDNA断片(10bp以上)も含まれる。また、センス鎖およびアンチセンス鎖からなるDNA断片もこの範疇にはいる。これらのDNA断片は遺伝子診断用のプローブとして用いることができる。

【0017】

【実施例】

次に実施例により発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。DNAの組換えに関する基本的な操作および酵素反応は、文献["Molecular Cloning. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989]に従った。制限酵素および各種修飾酵素は、特に記載の無い場合、宝酒造社製のものを用いた。各酵素反応の緩衝液組成、並びに反応条件は付属の説明書に従った。

【0018】

(1) cDNAクローニング

ヒト胃癌細胞cDNAライブラリー(WO97/03190記載)から選択したcDNAクローンの大規模塩基配列決定の結果、クローンHP01461を得た。本クローンは、81bpの5'非翻訳領域、1068bpのオープンリーディングフレーム、576bpの3'非翻訳領域、83bpのポリ(A)テールか

らなる構造を有していた（配列番号5）。オープンリーディングフレームは355アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしており、この配列を用いてプロテインデータベースを検索したところ、ヒトガレクチン-9ならびにマウスガレクチン-9アイソフォームのアミノ酸配列と高い類似性を有していた。表1に、本発明のヒトガレクチン様蛋白質（HS）とヒトガレクチン-9（G9）のアミノ酸配列の比較を、表2に、本発明のヒトガレクチン様蛋白質（HS）とマウスガレクチン-9アイソフォーム（MM）のアミノ酸配列の比較を示す。-はギャップを、*は本発明の蛋白質と同一アミノ酸残基を、.は本発明の蛋白質と類似アミノ酸残基をそれぞれ表す。本発明の蛋白質をヒトガレクチン-9と比較すると、次の6箇所に違いが認められた。すなわち、88番目のリジン（G9ではアルギニン）、96番目のグリシンの挿入、135番目のセリン（G9ではフェニルアラニン）、149番目から180番目までの32アミノ酸残基の挿入、270番目のプロリン（G9ではロイシン）、313番目のグルタミン酸（G9ではグリシン）である。本発明の蛋白質をマウスガレクチン-9アイソフォームと比較した場合、本発明の蛋白質の方が2アミノ酸残基長いだけで、全領域にわたって69.3%という類似性を示すことから、本発明の蛋白質は、マウスガレクチン-9アイソフォームの相同体と思われる。

【0019】

表1

HS MAFSGSQAPYLSPAVPFGSTIQGGLQDGLQITVNGTVLSSSGTRFAVNFGTGFSGNDIAF

G9 MAFSGSQAPYLSPAVPFGSTIQGGLQDGLQITVNGTVLSSSGTRFAVNFGTGFSGNDIAF

HS HFNPRFEDGGYVVCNTRQNGSWGPEERKTHMPFQKGMPFDLCFLVQSSDFKVMVNGILFV

G9 HFNPRFEDGGYVVCNTRQNGSWGPEERRTHMPFQK-MPFDLCFLVQSSDFKVMVNGILFV

HS QYFHRVPFHRVDTISVNGSVQLSYISFQNPRTVPVQPAFSTVPFSQPVCFPPRPRGRRQK

G9 QYFHRVPFHRVDTIFVNGSVQLSYISFQ-----

HS PPGVWPANPAPITQTVIHTVQSAPGQMFSTPAIPPMYPHPAYPMPFITTILGGLYPSKS

G9 PPGVWPANPAPITQTVIHTVQSAPGQMFSTPAIPPMYPHPAYPMPFITTILGGLYPSKS

HS ILLSGTVLPSAQRFHINLCGNHIAFHLNPRFDENAVRNTQIDNSWGSEERSLPRKMPF

G9 ILLSGTVLPSAQRFHINLCGNHIAFHLNLRFDENAVRNTQIDNSWGSEERSLPRKMPF

HS VRGQSFVWILCEAHCLKAVDGQHLFEYYHRLRNLPTINRLEVGGDIQLTHVQT

G9 VRGQSFVWILCGAHCLKAVDGQHLFEYYHRLRNLPTINRLEVGGDIQLTHVQT

【0020】

表2

HS MAFSGSQAPYLSPA VPFGSTIQGGLQDGLQITVNGTVLSSSGTRFAVNFGTGFSGNDIAF

. .*...* .**.*.*****.***.*..**. .* . **.***..*.*****

MM MALFSAQSPYINPIIPFTGPIQGGLQEGLQVTLQTT-KSFAQRFVVFQNSFNGNDIAF

HS HFNPREFEDGGYVVNCNTQNGSWGPEERKTHMPFQKGMPFDLCFLVQSSDFKVMVNGILFV

*****.*****.*** *** .*****.*****.***.*.***** .**

MM HFNPREFEEGGYVVNCNTQNGQWGPEERKMQMPFQKGMPFELCFLVQRSEFKVMVNKKFFV

HS QYFHRVPFHRVDTISVNGSVQLSYISFQNPRTVQPAFSTVPFSQPVCFPPRPRGRQQK

** ***.* ***.*..**.*.***. .***..***..***** ***. *.**.**

MM QYQHRVPYHLVDTIAVSGCLKLSFITFQNS-AAPVQHVFSTLQFSQPVQFPRTPKGRKQK

HS PPGVWPANPAPITQTVIHTVQSAPGQMFSTPAIPPMYPHPAYPMPFITTILGGLYPSKS

... .**..**..**.** *.*.*****.***..** ***..**.*.*****

MM TQNFRPAHQAPMAQTTIHMVHSTPGQMFSTPGIPPVYPTPAYTIPFYTPIPNGLYPSKS

HS ILLSGTVLPSAQRFHINLCGNHIAFHLNPRFDENAVRNTQIDNSWGSEERSLPRKMPF

*..**.***.* *** .*.*****.*****.*** *** **** .***

MM IMISGNVLPDATRFHINLRCGGDIAFHLNPRFNENAVVRNTQINNSWGQEERSLLGRMPF

HS VRGQSFVWILCEAHCLKAVDGQHLFEYYHRLRNLPTINRLEVGGDIQLTHVQT

*****.**.**.****.*****.*****.**.**.*****

MM SRGQSFSVWI ICEGHCFK VAVNGQHMCEYYHRLKNLQDINTLEVAGDIQLTHVQT

【0021】

(2) インビトロ翻訳による蛋白質合成

本発明のcDNAを有するベクターpHP01461を用いて、TNTウサギ網状赤血球溶解物キット（プロメガ社製）によるインビトロ翻訳を行なった。この際 [³⁵S]メチオニンを添加し、発現産物をラジオアイソトープでラベルした。いずれの反応もキットに付属のプロトコールに従って行なった。プラスミドpHP01416 2 μgを、TNTウサギ網状赤血球溶解物50 μl、緩衝液（キットに付属）4 μl、アミノ酸混合液（メチオニンを含まない）2 μl、[³⁵S]メチオニン（アマーシャム社）8 μl（0.37MBq/μl）、T7RNAポリメラーゼ2 μl、RNasin 80Uを含む総量100 μlの反応液中で30℃で90分間反応させた。反応液3 μlにSDSサンプリングバッファー（125 mMトリス塩酸緩衝液、pH 6.8、120 mM 2-メルカプトエタノール、2% SDS溶液、0.025% ブロモフェノールブルー、20% グリセロール）2 μlを加え、95℃3分間加熱処理した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。オートラジオグラフィーを行ない、翻訳産物の分子量を求めた結果、本発明のcDNAは、分子量約40 kDaの翻訳産物を生成した（図2）。この値は、配列番号2で表される塩基配列から予想される蛋白質の予想分子量39,517と一致し、このcDNAが確かに配列番号2で表される蛋白質をコードしていることが示された。

【0022】

(3) インビトロ翻訳産物のラクトース結合活性測定

セファロース4Bゲル懸濁液（ファルマシア社）100 mlを0.5M炭酸ナトリウムで十分洗浄した後、100 mlの0.5M炭酸ナトリウムに懸濁した。これにビニルスルホン10 mlを添加し、室温で1時間緩やかに攪拌した。ゲルを0.5M炭酸ナトリウムで洗浄した後、10% ラクトース、0.5M炭酸ナトリウム溶液に懸濁し室温で一晩緩やかに攪拌した。ゲルを0.5M炭酸ナトリウ

ム、水、0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)で順次洗浄した。得られたラクトース固定化セファロース4Bゲルは、0.02%アジ化ナトリウムを含む0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)中、4°Cで保存した。

【0023】

インビトロ翻訳反応液100μlを先に調製したラクトース固定化セファロース4Bカラム(ベッド容積4.5ml)にかけ、ラクトースカラム用カラム緩衝液(20mMトリス塩酸緩衝液、pH7.5、2mM EDTA、150mM NaCl、4mM2-メルカプトエタノール、0.01%Triton X-100)20mlで洗浄後、0.3Mラクトースを含むカラム緩衝液20mlで溶出した。その結果、溶出画分に40kDaの翻訳産物が含まれていることから、本発明の蛋白質はラクトース結合能を有することが示された(図2)。

【0024】

(4) 大腸菌によるガレクチン-4様蛋白質の発現とラクトース結合活性

プラスミドpHP01461 1μgを、20単位のEcoRIと20単位のNotIで消化した後、0.8%アガロースゲル電気泳動にかけ、約1.7kb pのDNA断片をゲルから切り出した。ついで、大腸菌用発現ベクターpET21a (Novagen社製) 1μgを20単位のEcoRIと20単位のNotIで消化した後、0.8%アガロースゲル電気泳動にかけ、約5.3kb pのDNA断片をゲルから切り出した。両者のDNA断片をライゲーションキットにより連結後、大腸菌JM109を形質転換した。形質転換体からプラスミドpET-1461を調製し、制限酵素切断地図により目的とする組換え体を確認した。

【0025】

2本のオリゴヌクレオチドプライマーPR1 (5' -CGCATATGGCC TTCAGCGGTTCCCCAGGC-3')とPR2 (5' -AACGGCA CCGTGGAGAAGGCAGGGCTGAACA-3')をDNA自動合成機(アプライドバイオシステムズ社)により付属のプロトコールに従い合成した。プラスミドpHP01461を1ngとプライマーPR1、PR2それぞれ100pmoleを用いて、PCRキット(宝酒造社)によりcDNAの5'側翻訳領域を増幅した。フェノール抽出、エタノール沈殿後、20単位のSacIとN

d e I で消化し、反応産物を 1. 2 % アガロースゲル電気泳動にかけ、約 320 b p の DNA 断片をゲルから切り出し精製した。

【0026】

プラスミド p E T - 1 4 6 1 1 μ g を、 20 単位の S a c I と N d e I で消化した後、 0. 8 % アガロースゲル電気泳動にかけ、 3. 8 k b p の DNA 断片をゲルから切り出した。この DNA 断片と先に P C R によって調製した約 320 b p の DNA 断片を、 ライゲーションキットにより連結後、 大腸菌 B L 2 1 (D E 3) を形質転換した。形質転換体からプラスミド p E T 1 4 6 1 を調製し、 制限酵素切断地図により目的とする組換え体を確認した。

【0027】

p E T 1 4 6 1 / B L 2 1 (D E 3) の一晩培養液 2 m l を 100 μ g / m l アンピシリン含有 LB 培地 200 m l に懸濁し、 37°C で振とう培養し、 A_{600} が約 0. 5 になったときにイソプロピルチオガラクトシドを 1 mM になるように添加した。さらに 37°C で 3 時間培養後、 遠心によって集菌し、 菌体をラクトースカラム用カラム緩衝液 25 m l に懸濁した。この溶液を超音波処理後、 遠心し、 上澄を先に調製したラクトース固定化セファロース 4 B カラム (ベッド容積 2 m l) にかけ、 ラクトースカラム用カラム緩衝液 10 m l で洗浄後、 0. 3 M ラクトースを含むカラム緩衝液 5 m l で溶出した。溶出してきた蛋白質を S D S - ポリアクリルアミド電気泳動にかけたところ、 40 k D a の位置に单一のバンドが認められた。この分子量の値は、 ヒトガレクチン - 9 様蛋白質の予想分子量と一致する。すなわち、 大腸菌で発現させたヒトガレクチン - 9 様蛋白質はラクトース結合活性を有することが示された。

【0028】

(5) ノザンプロットハイブリダイゼーション

ヒト組織における発現パターンを調べるため、 ノザンプロットハイブリダイゼーションを行った。ヒトの各組織から単離したポリ (A) ⁺ R N A をプロットしたフィルターをクローンテック社から購入した。プラスミド p H P 0 1 0 4 9 を A p a L I と B s t X I で消化した後、 アガロースゲル電気泳動にかけて c D N A 断片を単離したのち、 ランダムプライマーラベリングキット (宝酒造社) によ

り、 $[^{32}\text{P}]$ dCTP (アマーシャム社) で標識した。また、挿入部分については、合成オリゴヌクレオチド 5' - AACGGCACCGTGGAGAAGGC AGGCTGAGCA - 3' を、T4ポリヌクレオチドキナーゼで末端 ^{32}P 標識を行った。ハイブリダイゼーションは、プロットペーパーに付属の溶液を用いプロトコールに従って行った。

【0029】

cDNA断片をプローブとした場合、末梢血で最も強い発現が認められ、他に心臓、胎盤、肺、脾臓、胸腺、卵巣、小腸、大腸で発現が認められた。いずれも転写産物の大きさは、約2kであった(図3)。一方、挿入部分をプローブとして用いた場合には、これとは異なった結果を示した(図4)。約2kのバンドが、最も強いのは、小腸と大腸であり、他に肺、末梢血で弱い発現が認められた。この大きさのバンド以外に、肝臓で1k以下の強いバンドが、また腎臓で約2.4kのバンドが見られた。このように、挿入部分をプローブとして用いた場合、ヒトガレクチン-9の発現パターンと異なることから、本発明の蛋白質は、既知のヒトガレクチン-9とは異なる発現制御を受けていることが示され、その機能も異なることが予想される。

【0030】

【発明の効果】

本発明はガレクチン-9様蛋白質をコードするヒトcDNA、このヒトcDNAがコードする蛋白質を提供する。本発明のcDNAを用いることにより、該組換え蛋白質を大量に発現することができる。該組換え蛋白質は、医薬・研究用試薬として利用することができる。

【0031】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：32

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

ハイポセティカル：No

起源：

生物名：ホモ＝サピエンス

細胞の種類：胃癌組織

クローン名：HP01461

配列

Asn Pro Arg Thr Val Pro Val Gln Pro Ala Phe Ser Thr Val Pro Phe
1 5 10 15
Ser Gln Pro Val Cys Phe Pro Pro Arg Pro Arg Gly Arg Arg Gln Lys
20 25 30

【0032】

配列番号：2

配列の長さ：355

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

ハイポセティカル：No

起源：

生物名：ホモ＝サピエンス

細胞の種類：胃癌組織

クローン名：HP01461

配列

Met Ala Phe Ser Gly Ser Gln Ala Pro Tyr Leu Ser Pro Ala Val Pro
1 5 10 15
Phe Ser Gly Thr Ile Gln Gly Gly Leu Gln Asp Gly Leu Gln Ile Thr
20 25 30
Val Asn Gly Thr Val Leu Ser Ser Gly Thr Arg Phe Ala Val Asn
35 40 45
Phe Gln Thr Gly Phe Ser Gly Asn Asp Ile Ala Phe His Phe Asn Pro

50	55	60
Arg Phe Glu Asp Gly Gly Tyr Val Val Cys Asn Thr Arg Gln Asn Gly		
65	70	75
Ser Trp Gly Pro Glu Glu Arg Lys Thr His Met Pro Phe Gln Lys Gly		
85	90	95
Met Pro Phe Asp Leu Cys Phe Leu Val Gln Ser Ser Asp Phe Lys Val		
100	105	110
Met Val Asn Gly Ile Leu Phe Val Gln Tyr Phe His Arg Val Pro Phe		
115	120	125
His Arg Val Asp Thr Ile Ser Val Asn Gly Ser Val Gln Leu Ser Tyr		
130	135	140
Ile Ser Phe Gln Asn Pro Arg Thr Val Pro Val Gln Pro Ala Phe Ser		
145	150	155
Thr Val Pro Phe Ser Gln Pro Val Cys Phe Pro Pro Arg Pro Arg Gly		
165	170	175
Arg Arg Gln Lys Pro Pro Gly Val Trp Pro Ala Asn Pro Ala Pro Ile		
180	185	190
Thr Gln Thr Val Ile His Thr Val Gln Ser Ala Pro Gly Gln Met Phe		
195	200	205
Ser Thr Pro Ala Ile Pro Pro Met Met Tyr Pro His Pro Ala Tyr Pro		
210	215	220
Met Pro Phe Ile Thr Thr Ile Leu Gly Gly Leu Tyr Pro Ser Lys Ser		
225	230	235
Ile Leu Leu Ser Gly Thr Val Leu Pro Ser Ala Gln Arg Phe His Ile		
245	250	255
Asn Leu Cys Ser Gly Asn His Ile Ala Phe His Leu Asn Pro Arg Phe		
260	265	270
Asp Glu Asn Ala Val Val Arg Asn Thr Gln Ile Asp Asn Ser Trp Gly		
275	280	285

Ser Glu Glu Arg Ser Leu Pro Arg Lys Met Pro Phe Val Arg Gly Gln
 290 295 300
 Ser Phe Ser Val Trp Ile Leu Cys Glu Ala His Cys Leu Lys Val Ala
 305 310 315 320
 Val Asp Gly Gln His Leu Phe Glu Tyr Tyr His Arg Leu Arg Asn Leu
 325 330 335
 Pro Thr Ile Asn Arg Leu Glu Val Gly Gly Asp Ile Gln Leu Thr His
 340 345 350
 Val Gln Thr
 355

【0033】

配列番号：3

配列の長さ：96

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源：

生物名：ホモ＝サピエンス

細胞の種類：胃癌組織

クローン名：HP01461

配列

AACCCCCGCA CAGTCCCTGT TCAGCCTGCC TTCTCCACGG TGCCGTTCTC CCAGCCTGTC	60
TGTTTCCAC CCAGGCCAG GGGGCGCAGA CAAAAA	96

【0034】

配列番号：4

配列の長さ：1065

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源：

生物名：ホモ＝サピエンス

細胞の種類：胃癌組織

クローン名：HP01461

配列

ATGGCCTTCA	GC GG TT CCCA	GG CT CC CT AC	CT GAG T CC AG	CT GT CC C C TT	TT CT GGG ACT	60
ATT CA AGG AG	GT CT CC AG GA	CG GACT TC AG	AT CA CT GT CA	AT GG GAC CGT	TCT CAG CT CC	120
AGT GG AA ACCA	GG TT TG CT GT	GA ACT TT CAG	ACT GG CT TCA	GT GG AA AT GA	CATT GC CT TC	180
CA CT CA ACCC	CT CG GT TT GA	AG AT GG AG GG	TAC GT GG GT	GCA AC AC GAG	GC AG A AC CG GA	240
AG CT GG GG GC	CC GAG GG AG AG	GA AG AC AC AC	AT GC CT TT CC	AG AAG GGG AT	GCC CTT GAC	300
CT CT GCT TCC	TGG TGC AG AG	CT CAG AT TC	AAG GT GAT GG	TGA AC CG GG AT	CCT CT TCG T	360
CAG TACT TCC	ACC GCG TG CC	CTT CC ACC GT	GT GG AC AC CA	TCT CC GT CAA	TGG CT CT GT G	420
CAG CT GT CCT	AC AT CAG CTT	CC AG A AC CCC	CG CAC A GTC C	CT GTT CAG CC	TGC CT TCT CC	480
AC GGT GCG GT	TCT CCC AG CC	TGT CT GT TT C	CC ACC CAG GC	CC AG GGG GCG	CAG AC A AAAA	540
CCT CCC GG CG	TGT GGG CT GC	CA ACC CCG CT	CCC ATT AC CC	AG AC AG TC AT	CC AC AC AG TG	600
CAG AG CG CCC	CT GG AC AG AT	GTT CT CT ACT	CCC G CC AT CC	CAC CT AT GAT	GT ACC C C C AC	660
CCC G C CT AT C	CG AT GC CTT T	CAT C ACC ACC	ATT CT GGG AG	GG CT GT AC CC	AT CC A AG T CC	720
AT C CT CCT GT	CAG GG C ACT GT	CCT G CC C AG T	GCT CAG AG GT	TCC AC AT CAA	CCT GT GCT CT	780
GG G A ACC ACA	TC G C CT TCC A	CCT G A AC CCC	CG TTT GAT G	AG AAT GCT GT	GG TCC GCA AC	840
AC CC AG AT CG	AC A ACT C CT G	GG GGT CT GAG	GAG CG A AG TC	TG C C C G AAA	AAT G C C C TT C	900
GT C CG TGG CC	AG AG C TT CTC	AG TGT GG AT C	TT GT GT GA AG	CT C ACT G C CT	CA AG GT GG CC	960
GT GG AT GGT C	AG CAC CT GT TT	TGA AT ACT AC	CAT G C C TGA	GG A AC CT G CC	CA CC AT CA AC	1020
AG ACT GG AAG	TGG GGG GCG A	CAT CC AG CT G	AC CC AT GT G C	AG AC A		1065

【0035】

配列番号：5

配列の長さ：1725

配列の型：核酸

鎖の数： 二本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： cDNA to mRNA

起源：

生物名： ホモ=サピエンス

細胞の種類： 胃癌組織

クローン名： H P O 1 4 6 1

配列の特徴：

特徴を表す記号： CDS

存在位置： 82.. 1149

配列

TTTCTTTGTT	AAGTCGTTCC	CTCTACAAAG	GACTTCCTAG	TGGGTGTGAA	AGGCAGCGGT	60										
GGCCACAGAG	GCAGCGGAGA	G	ATG	GCC	TTC	AGC	GGT	TCC	CAG	GCT	CCC	TAC	111			
Met Ala Phe Ser Gly Ser Gln Ala Pro Tyr																
1				5								10				
CTG	AGT	CCA	GCT	GTC	CCC	TTT	TCT	GGG	ACT	ATT	CAA	GGA	GGT	CTC	CAG	159
Leu	Ser	Pro	Ala	Val	Pro	Phe	Ser	Gly	Thr	Ile	Gln	Gly	Gly	Leu	Gln	
15				20										25		
GAC	GGA	CTT	CAG	ATC	ACT	GTC	AAT	GGG	ACC	GTT	CTC	AGC	TCC	AGT	GGA	207
Asp	Gly	Leu	Gln	Ile	Thr	Val	Asn	Gly	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ser	Gly	
30				35										40		
ACC	AGG	TTT	GCT	GTG	AAC	TTT	CAG	ACT	GGC	TTC	AGT	GGA	AAT	GAC	ATT	255
Thr	Arg	Phe	Ala	Val	Asn	Phe	Gln	Thr	Gly	Phe	Ser	Gly	Asn	Asp	Ile	
45				50										55		
GCC	TTC	CAC	TTC	AAC	CCT	CGG	TTT	GAA	GAT	GGA	GGG	TAC	GTG	GTG	TGC	303
Ala	Phe	His	Phe	Asn	Pro	Arg	Phe	Glu	Asp	Gly	Gly	Tyr	Val	Val	Cys	
60				65										70		
AAC	ACG	AGG	CAG	AAC	GGA	AGC	TGG	GGG	CCC	GAG	GAG	AGG	AAG	ACA	CAC	351
Asn	Thr	Arg	Gln	Asn	Gly	Ser	Trp	Gly	Pro	Glu	Glu	Arg	Lys	Thr	His	

75	80	85	90	
ATG CCT TTC CAG AAG GGG ATG CCC TTT GAC CTC TGC TTC CTG GTG CAG				399
Met Pro Phe Gln Lys Gly Met Pro Phe Asp Leu Cys Phe Leu Val Gln				
95	100	105		
AGC TCA GAT TTC AAG GTG ATG GTG AAC GGG ATC CTC TTC GTG CAG TAC				447
Ser Ser Asp Phe Lys Val Met Val Asn Gly Ile Leu Phe Val Gln Tyr				
110	115	120		
TTC CAC CGC GTG CCC TTC CAC CGT GTG GAC ACC ATC TCC GTC AAT GGC				495
Phe His Arg Val Pro Phe His Arg Val Asp Thr Ile Ser Val Asn Gly				
125	130	135		
TCT GTG CAG CTG TCC TAC ATC AGC TTC CAG AAC CCC CGC ACA GTC CCT				543
Ser Val Gln Leu Ser Tyr Ile Ser Phe Gln Asn Pro Arg Thr Val Pro				
140	145	150		
GTT CAG CCT GCC TTC TCC ACG GTG CCG TTC TCC CAG CCT GTC TGT TTC				591
Val Gln Pro Ala Phe Ser Thr Val Pro Phe Ser Gln Pro Val Cys Phe				
155	160	165	170	
CCA CCC AGG CCC AGG GGG CGC AGA CAA AAA CCT CCC GGC GTG TGG CCT				639
Pro Pro Arg Pro Arg Gly Arg Arg Gln Lys Pro Pro Gly Val Trp Pro				
175	180	185		
GCC AAC CCG GCT CCC ATT ACC CAG ACA GTC ATC CAC ACA GTG CAG AGC				687
Ala Asn Pro Ala Pro Ile Thr Gln Thr Val Ile His Thr Val Gln Ser				
190	195	200		
GCC CCT GGA CAG ATG TTC TCT ACT CCC GCC ATC CCA CCT ATG ATG TAC				735
Ala Pro Gly Gln Met Phe Ser Thr Pro Ala Ile Pro Pro Met Met Tyr				
205	210	215		
CCC CAC CCC GCC TAT CCG ATG CCT TTC ATC ACC ACC ATT CTG GGA GGG				783
Pro His Pro Ala Tyr Pro Met Pro Phe Ile Thr Thr Ile Leu Gly Gly				
220	225	230		
CTG TAC CCA TCC AAG TCC ATC CTC CTG TCA GGC ACT GTC CTG CCC AGT				831

Leu Tyr Pro Ser Lys Ser Ile Leu Leu Ser Gly Thr Val Leu Pro Ser
 235 240 245 250
 GCT CAG AGG TTC CAC ATC AAC CTG TGC TCT GGG AAC CAC ATC GCC TTC 879
 Ala Gln Arg Phe His Ile Asn Leu Cys Ser Gly Asn His Ile Ala Phe
 255 260 265
 CAC CTG AAC CCC CGT TTT GAT GAG AAT GCT GTG GTC CGC AAC ACC CAG 927
 His Leu Asn Pro Arg Phe Asp Glu Asn Ala Val Val Arg Asn Thr Gln
 270 275 280
 ATC GAC AAC TCC TGG GGG TCT GAG GAG CGA AGT CTG CCC CGA AAA ATG 975
 Ile Asp Asn Ser Trp Gly Ser Glu Glu Arg Ser Leu Pro Arg Lys Met
 285 290 295
 CCC TTC GTC CGT GGC CAG AGC TTC TCA GTG TGG ATC TTG TGT GAA GCT 1023
 Pro Phe Val Arg Gly Gln Ser Phe Ser Val Trp Ile Leu Cys Glu Ala
 300 305 310
 CAC TGC CTC AAG GTG GCC GTG GAT GGT CAG CAC CTG TTT GAA TAC TAC 1071
 His Cys Leu Lys Val Ala Val Asp Gly Gln His Leu Phe Glu Tyr Tyr
 315 320 325 330
 CAT CGC CTG AGG AAC CTG CCC ACC ATC AAC AGA CTG GAA GTG GGG GGC 1119
 His Arg Leu Arg Asn Leu Pro Thr Ile Asn Arg Leu Glu Val Gly Gly
 335 340 345
 GAC ATC CAG CTG ACC CAT GTG CAG ACA TAGGCGGCTT CCTGGCCCTG GGGC 1170
 Asp Ile Gln Leu Thr His Val Gln Thr
 350 355
 CGGGGGCTGG GGTGTGGGGC AGTCTGGTC CTCTCATCAT CCCCACCTCC CAGGCCAGC 1230
 CTTTCCAACC CTGCCCTGGGA TCTGGGCTTT AATGCAGAGG CCATGTCCTT GTCTGGTCCT 1290
 GCTTCTGGCT ACAGGCCACCC TGGAACGGAG AAGGCAGCTG ACGGGGATTG CCTTCCTCAG 1350
 CCGCAGCAGC ACCTGGGGCT CCAGCTGCTG GAATCCTACC ATCCCAGGAG GCAGGCACAG 1410
 CCAGGGAGAG GGGAGGGAGTG GGCAGTGAAG ATGAAGCCCC ATGCTCAGTC CCCTCCCATC 1470
 CCCCCACGGCAG CTCCACCCCCA GTCCCAAGGCC ACCAGCTGTC TGCTCCTGGT GGGAGGTGGC 1530

CTCCTCAGCC CCTCCTCTCT GACCTTAAC CTCACTCTCA CCTTGCACCG TGCACCAACC	1590
CTTCACCCCT CCTGGAAAGC AGGCCTGATG GCTTCCCACT GGCTCCACC ACCTGACCAG	1650
AGTGTCTCT TCAGAGGACT GGCTCCTTTC CGAGTGTCCCT TAAAATAAAG AAATGAAAAT	1710
GCTTGTGGC ACATT	1725

【0036】

【図面の簡単な説明】

【図1】 プラスミドpHP01461の構造を表す図である。

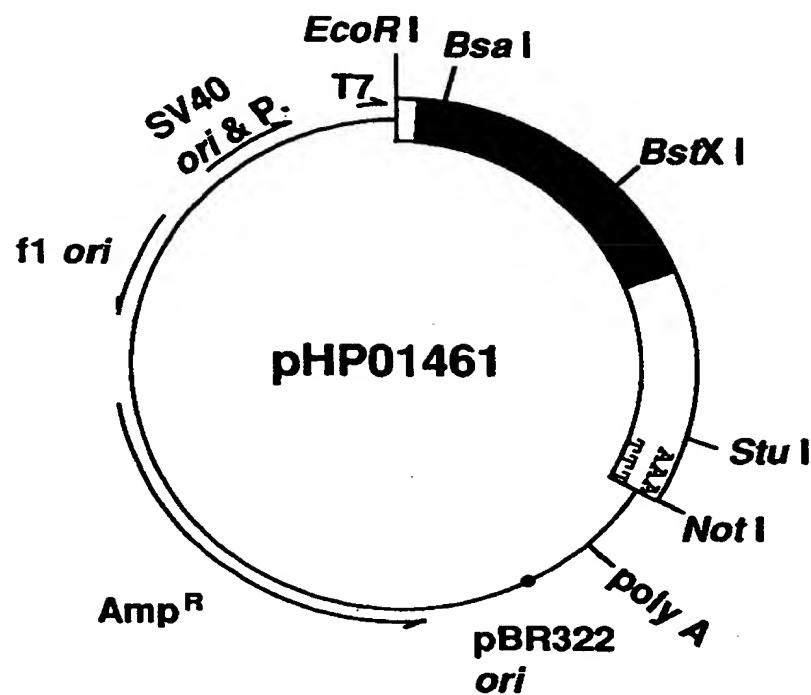
【図2】 (1) インビトロ翻訳したヒトガレクチン-9様蛋白質並びに (2) ラクトースカラムに結合したヒトガレクチン-9様蛋白質の SDS-PAGEによる解析結果を示す図である。

【図3】 cDNA断片をプローブとして用いて、ノーザンプロットハイブリダイゼーションを行った結果を示す図である。

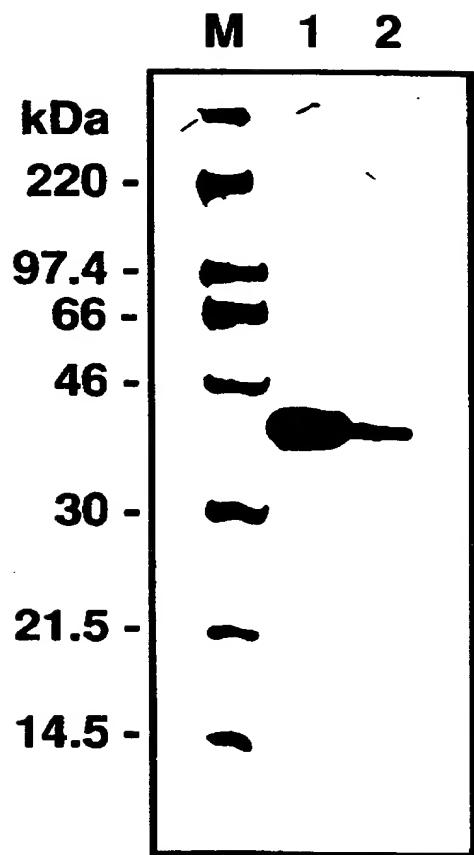
【図4】 挿入部分のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いて、ノーザンプロットハイブリダイゼーションを行った結果を示す図である。

【書類名】 図面

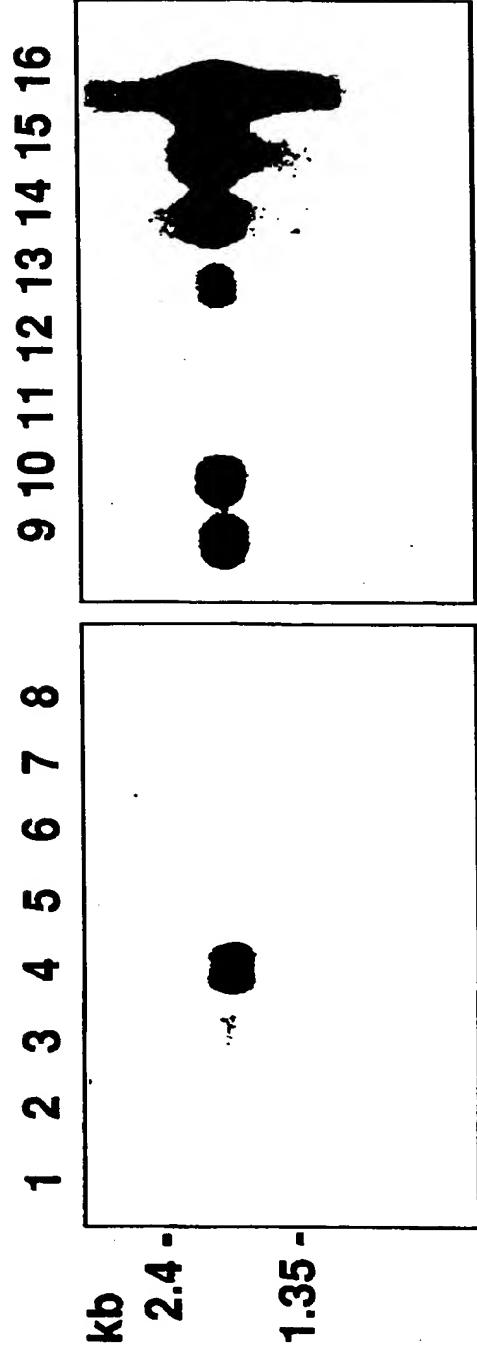
【図1】



【図2】

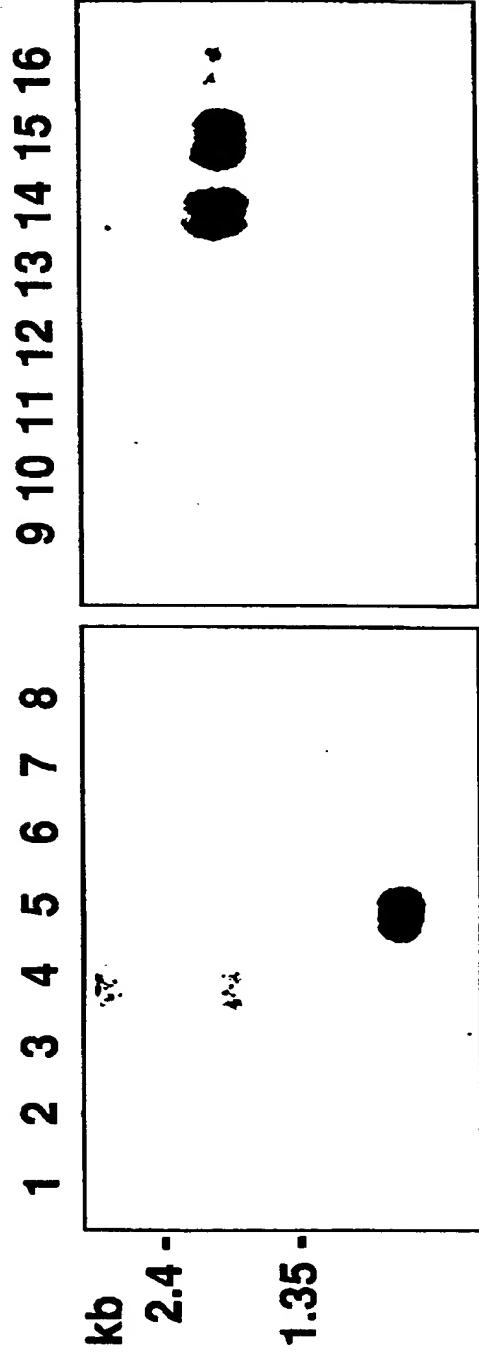


【図3】



1, 心臓; 2, 脳; 3, 胎盤; 4, 肺; 5, 肝臓; 6, 骨格筋; 7, 腎臓; 8, 脾臓; 9, 肺臓; 10, 胸腺;
11, 前立腺; 12, 睾丸; 13, 卵巣; 14, 小腸; 15, 大腸; 16, 末梢血白血球

【图4】



1, 心臟; 2, 腦; 3, 胎盤; 4, 肺; 5, 肝臟; 6, 骨格筋; 7, 腎臟; 8, 脾臟; 9, 胸腺;
 11, 前立腺; 12, 睾丸; 13, 卵巢; 14, 小腸; 15, 大腸; 16, 末梢血白血球

【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 胃腸に特異的に発現しているラクトース結合蛋白質ガレクチン-9様蛋白質およびそれをコードするヒトcDNAを提供する。

【構成】 ガレクチン-9様蛋白質をコードするヒトcDNAのクローニング、このヒトcDNAがコードする蛋白質の大腸菌による発現、および発現産物のラクトース結合活性測定からなる。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

〈認定情報・付加情報〉

【特許出願人】 申請人
【識別番号】 000173762
【住所又は居所】 神奈川県相模原市西大沼4丁目4番1号
【氏名又は名称】 財団法人相模中央化学研究所
【特許出願人】
【識別番号】 596134998
【住所又は居所】 東京都目黒区中町2丁目20番3号
【氏名又は名称】 株式会社プロテジーン

出願人履歴情報

識別番号 [000173762]

1. 変更年月日 1995年 4月14日

[変更理由] 住所変更

住 所 神奈川県相模原市西大沼4丁目4番1号

氏 名 財団法人相模中央化学研究所

出願人履歴情報

識別番号 [596134998]

1. 変更年月日 1996年 9月13日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都目黒区中町2丁目20番3号
氏 名 株式会社プロテジーン